

ВЛИЯНИЕ ФУЛЛЕРЕНОЛА НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН, СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ИХ АНТИРАДИКАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ В ПРОРОСТКАХ ЯЧМЕНЯ

О.В. Молчан, Л.В. Обуховская, **В.Г. Реутский**

*Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Б, Минск,
Республика Беларусь*

e-mail: olga_molchan@mail.ru

Введение

Получение углеродных наноматериалов, в том числе, фуллеренов и их производных, а также исследование их физико-химических свойств в настоящее время является одним из наиболее динамично развивающихся направлений органической химии [1]. Особенное внимание привлекает получение модифицированных биологически активных фуллеренов, содержащих так называемые «фармакофорные» группы [1, 2]. Однако, несмотря на успехи химического синтеза, биологическая активность этих соединений изучена явно недостаточно. При этом большая часть работ сфокусирована на исследованиях их терапевтической активности и цитотоксичности по отношению к клеткам животных и микроорганизмов [2–4]. Изучению влияния фуллеренов и их производных на растительный организм посвящены лишь единичные публикации [4–7].

Цель данной работы – исследование влияния полигидроксилированного фуллерена (фуллеренола $[C_{60}(OH)_{24-26}]$) на прорастание семян, содержание суммы фенольных соединений и их антирадикальную активность в проростках ячменя.

Методы исследования

Объектами исследования являлись семена и проростки ячменя *Hordeum vulgare* L. сорта «Альфа». Семена проращивали при 24°C в полной темноте на фильтровальной бумаге в стерильных чашках Петри, одним из слоев фильтровальной бумаги семена накрывали. Фильтровальную бумагу увлажняли стерильной деионизированной водой либо раствором фуллеренола в концентрации 0,00001–0,01%. Использовали фуллеренол $[C_{60}(OH)_{24-26}]$ производства НПК «Нео-ТекПродакт» (г. Санкт-Петербург). В первые сутки прорастания подсчитывали количество наклюнувшихся семян и семян с появившимся зародышевым корешком [8]. При определении энергии прорастания и всхожести оценку и учет проросших семян проводили согласно ГОСТ 12038-84 на 3 и 7 сутки, соответственно [9].

Сырую массу, содержание сухого вещества, сумму фенольных соединений и их антирадикальную активность определяли в надземной части 3-х дневных проростков. Возраст проростков отсчитывали со дня замачивания. Ткань высушивали до абсолютно сухой массы при 60°C. Экстракцию фенольных соединений проводили 80% этанолом при 80°C в течение 30 минут двукратно. Полученные экстракты объединяли и использовали для анализа. Содержание суммы фенольных соединений определяли по стандартной методике с реактивом Фолина-Чокальтеу [10, 11]. Антиоксидантную активность оценивали по реакции с 0,002% раствором DPPH (дифенил-2-пикрил-гидразил). Процент ингибирования Р (%) активности DPPH рассчитывали по формуле 1:

$$P = (A-B)/A \cdot 100, \quad (1)$$

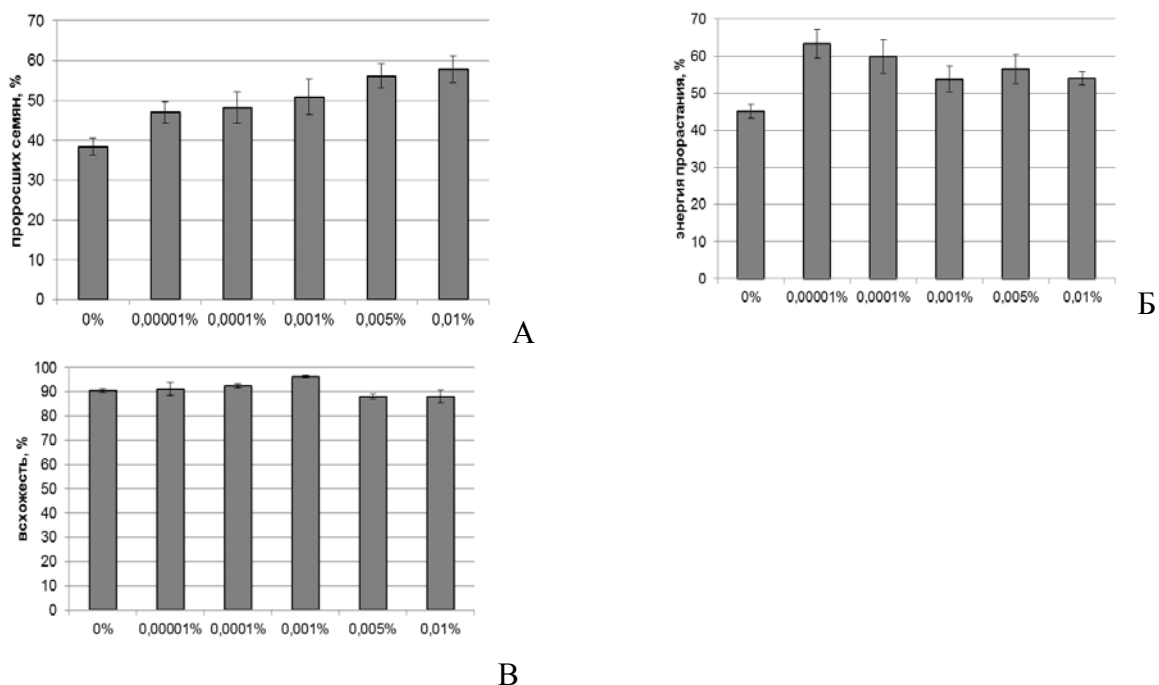
где А - оптическая плотность контроля (80% этанол + раствор DPPH) и В – оптическая плотность образца (экстракт + раствор DPPH) [12].

Эксперименты проводили в 4-5-кратной повторности. Данные на рисунках представлены как среднее арифметическое и ошибка средней величины. Различия между средними показателями оценивали при уровне значимости (р) не более 0,05.

Результаты и обсуждение

Анализ литературных данных показывает, что опубликованные к настоящему времени результаты исследований о влиянии фуллеренов и их производных на растительный организм не только малочисленны, но и весьма противоречивы. Так, было показано, что фуллерен C_{60} в концентрации $500 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ редуцирует прирост биомассы проростков кукурузы и сои [5]. Установлен также ингибиторный эффект одной из водорастворимых форм фуллерена $[C_{70}(C(COOH)_2)_{4-8}]$ в концентрации $0,005\text{--}0,02 \text{ мг/мл}$ на рост проростков арабидопсиса [5]. С другой стороны, обнаружено, что полигидроксिलированный фуллерен $[C_{60}(OH)_{20}]$ в концентрации $0,9\text{--}47,2 \text{ нМ}$ стимулирует прорастание семян, накопление биомассы, а также увеличивает содержание противоопухолевых и антидиабетических соединений в тканях тропической лианы *Momordica charantia* [7]. Данные противоречия могут быть обусловлены как видоспецифичностью к действию фуллеренов и физиологическим состоянием исследуемых растений, так и особенностями химической структуры и концентрацией используемых наночастиц.

Поэтому, прежде всего, нами были проведены исследования влияния фуллеренола $[C_{60}(OH)_{24-26}]$ в широком ($0,00001\text{--}0,01\%$) диапазоне концентраций на прорастание семян ячменя. Спустя 24 часа после начала прорастания подсчитывали число наклюнувшихся семян и семян с появившимся зародышевым корешком. Было установлено, что в присутствии полигидроксिलированного фуллерена количество проросших семян в первые сутки было на $10\text{--}20\%$ выше по сравнению с контролем (рисунок 1А). Причем, как видно на рисунке 1А, увеличение концентрации фуллеренола приводило к дополнительной стимуляции прорастания. Максимальное количество (около 60%) проросших семян было отмечено в вариантах, содержащих высокие ($0,005$ и $0,01\%$) концентрации наночастиц.



А – количество наклюнувшихся семян и семян с появившимся зародышевым корешком на первые сутки прорастания, Б – энергия прорастания, В – всхожесть

Рисунок 1 – Влияние фуллеренола на прорастание семян ячменя

Как известно, при прорастании сначала в семена по физическим законам поступает вода, а затем активируются различные физиолого-биохимические процессы. Стимулирующее влияние фуллеренола на прорастание семян в первые сутки, таким образом, может быть обусловлено, как интенсификацией поглощения воды и набухания, так и активацией процессов метаболизма. Полигидроксिलированный фуллерен является

водорастворимым соединением и может поступать в семена уже на первых этапах набухания с током воды. Кроме того, возможно, молекулы фуллеренола способны инициировать образование проколов в оболочке семени, ускоряя, таким образом, поступление воды. Подобный эффект был установлен при исследовании влияния углеродных нанотрубок на прорастание семян томата [13]. С другой стороны, накапливаясь в прорастающих семенах, фуллеренол может воздействовать на процессы, связанные с активной структурной, физиологической и биохимической перестройкой.

При оценке таких параметров, как энергия прорастания и всхожесть, учитывали только «нормально проросшие семена», имеющие не менее двух развитых корешков размером более длины семени и побег размером не менее половины длины семени согласно ГОСТ 12038-84 [9]. Как показано на рисунке 1Б, в присутствии наночастиц энергия прорастания также выше на 10-20% по сравнению с контролем. Обращает на себя внимание более выраженный эффект низких (0,00001 и 0,0001%) и менее эффективное воздействие высоких (0,005 и 0,01%) концентраций фуллеренола по сравнению с их влиянием на прорастание в первые сутки (рисунок 1А). Возможно, накопление в прорастающих семенах наночастиц в большом количестве (в присутствии фуллеренола в высокой концентрации) приводит к некоторому торможению ростовых процессов. Меньший эффект высоких концентраций фуллеренола (в особенности 0,01%) может быть связан также с формированием его агрегатов. Так, известно, что фуллеренол при растворении в воде в концентрации 1–5 ммоль/дм³ формирует полианионные наноагрегаты размером 20–100 нм, которые могут аккумулироваться в клетках и тканях, препятствовать току питательных и регуляторных элементов, приводя к задержке ростовых процессов [14, 15]. С другой стороны, активность углеродных наноматериалов, поглощенных растением, зависит от их взаимодействия с органическими соединениями в гетерогенной клеточной среде. Так, было установлено, что природные органические материалы, связываясь с фуллереном C₇₀, повышают его гидрофильность [16]. Известно также, что для биологических эффектов наночастиц часто не наблюдают классическую зависимость доза-эффект из-за их способности формировать агрегаты в гетерогенных средах, которыми является содержимое клетки [5].

При оценке всхожести семян ячменя на 7 сутки прорастания было установлено, что количество нормально проросших семян является практически одинаковым в контроле и при концентрации фуллеренола 0,00001–0,01% (рисунок 1В). Незначительный стимулирующий эффект был обнаружен при воздействии наночастиц в концентрации 0,001%. Несколько ниже были средние значения показателей всхожести для семян, прораставших в присутствии 0,005 и 0,1% фуллеренола, однако достоверно от контрольных значений они не отличались, что также видно на рисунке 1В. Таким образом, и в контрольном варианте, и в присутствии фуллеренола всхожесть составляла в среднем около 90%.

Важно было также оценить воздействие фуллеренола на физиологическое состояние проростков. Визуальных различий между проростками в контроле и в присутствии фуллеренола отмечено не было. При этом, поскольку под действием фуллеренола наблюдали увеличение скорости прорастания (рисунок 1 А, Б), закономерным было обнаружение стимуляции прироста биомассы надземной части этих проростков в присутствии наночастиц по сравнению с контролем. Так, в среднем сырая масса надземной части десяти 3-х дневных проростков в присутствии фуллерена была на 10-20% больше по сравнению с контролем (рисунок 2А). Максимальный прирост массы был отмечен под влиянием наименьших из исследованных концентраций фуллеренола (0,00001 и 0,0001%). При этом, как видно на рисунке 2Б, наблюдалось незначительное снижение содержания сухого вещества в растениях, прораставших в присутствии фуллеренола. Таким образом, увеличение биомассы проростков под влиянием фуллеренола, скорее всего, обусловлено активацией поступления воды и процессов роста растяжением.

Как уже было отмечено, накопление фуллеренола тканями может влиять на метаболические процессы, связанные с прорастанием семян и дальнейшим ростом растения.

Важнейшими среди них являются процессы дыхания и сопутствующие окислительно-восстановительные реакции, а также различные биосинтезы [17]. Неотъемлемой частью стимуляции процессов метаболизма при выходе из состояния покоя является повышение концентрации активных форм кислорода и активация антиоксидантной системы в клетках прорастающих семян [18].

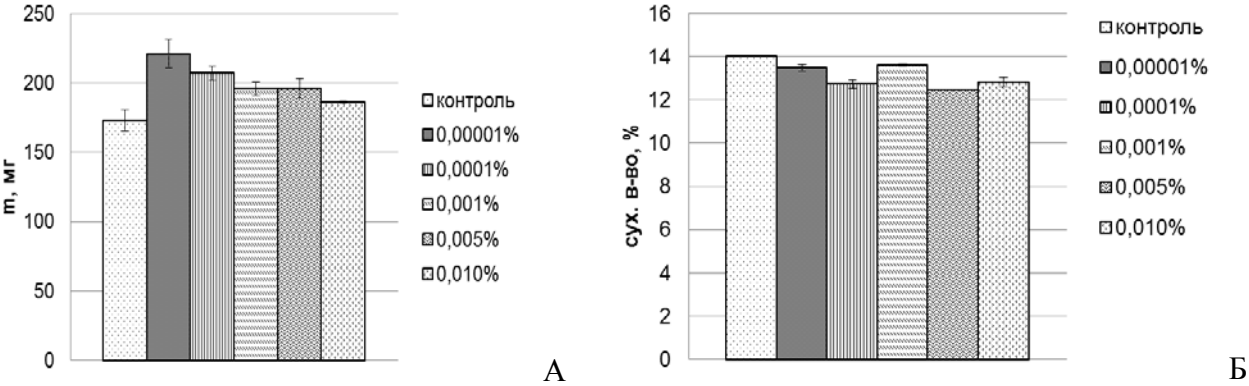


Рисунок 2 – Влияние фуллеренола на сырую массу 10 проростков (А) и содержание сухого вещества (Б)

Фенольные соединения являются мощными антиоксидантами [19]. В связи с вышесказанным было важно определить влияние фуллеренола при прорастании на сумму фенольных соединений в проростках ячменя. Интерес к исследованию содержания фенольных соединений в данной работе был обусловлен также их функциями в качестве структурных компонентов в образовании клеток и тканей, запасных дыхательных субстратов и индукторов различных сигналов при взаимодействии растения с окружающей средой [19].

Как видно на рисунке 3А, максимальное содержание суммы фенольных соединений отмечено для контрольных растений. В тканях надземной части 3-х дневных проростков, выросших в присутствии фуллеренола, содержание фенольных соединений снижается от $0,77 \pm 0,01$ мг/г сухой массы (контроль) до $0,62 \pm 0,01$ мг/г сухой массы (0,005 % фуллеренола). Хотя, учитывая активацию прорастания и накопления сырой массы под влиянием фуллеренолов (рисунки 1 А, Б и 2А), ожидалось обнаружение и стимуляции синтеза фенольных соединений в тканях проростков. Ранее было показано, что у двухдневных этиолированных проростков кукурузы сумма фенольных соединений за сутки увеличивается от 0,2 до 1 мг/г сырой массы, что связано с активацией метаболических процессов, в том числе и дыхания, при прорастании [20].

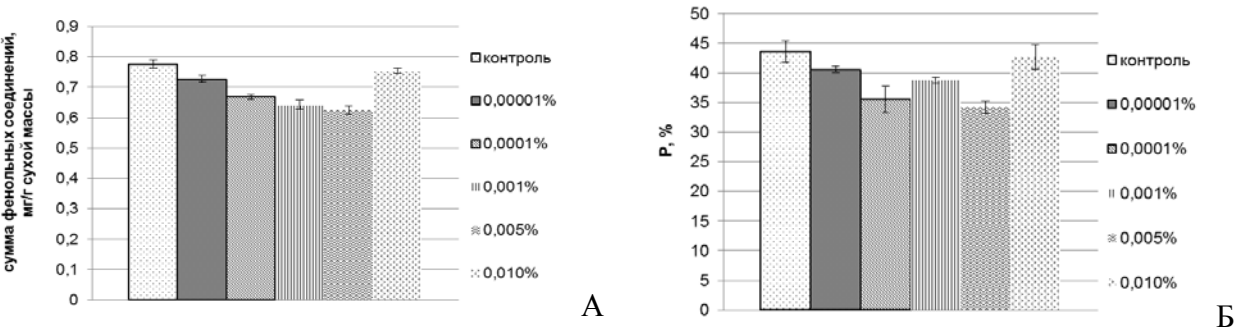


Рисунок 3 – Влияние фуллеренола на содержание суммы фенольных соединений (А) и их антирадикальную активность (Б)

Скорее всего, снижение содержания суммы фенольных соединений в тканях проростков ячменя под действием фуллеренола (рисунок 3А) обусловлено его собственной антиоксидантной активностью. Данное предположение подтверждается схожим характером

изменения антирадикальной активности экстрактов на основе 80 % этанола, полученных из исследуемых проростков, в зависимости от содержания фуллеренола (рисунок 3Б). Так, под влиянием фуллеренола (от 0,00001 до 0,005%) антирадикальная активность снижалась в среднем на 10% от $43,70 \pm 1,81\%$ (контроль) до $34,93 \pm 0,96\%$ (0,005%).

Важно также отметить, что величины суммы фенольных соединений, и их антирадикальной активности в проростках в присутствии фуллеренола в концентрации 0,01% достигали контрольных значений и составляли $0,75 \pm 0,01$ мг/г сухой массы и $42,66 \pm 2,07\%$, соответственно (рисунок 3). Можно предположить, что фуллерен в концентрации 0,01% стимулирует в проростках развитие стрессовой реакции, приводящей к активации антиоксидантной системы и, в частности, к синтезу фенольных соединений. Таким образом, под действием фуллеренола в клетках проростков могут накапливаться фенольные соединения, обладающие антирадикальной активностью.

Выводы

В результате проведенных исследований было установлено, что фуллеренол стимулирует скорость прорастания семян ячменя. Причем в первые сутки прорастания более выраженным оказывается эффект высоких, а при оценке энергии прорастания на третьи сутки – низких концентраций фуллеренола. Прирост биомассы этиолированных проростков фуллеренол может активировать преимущественно за счет поступления воды. Было показано также влияние фуллеренола на содержание фенольных соединений, обладающих антирадикальной активностью. Фуллерены и их производные известны как мощные, нетоксичные антиоксиданты и соединения, проявляющие антивирусную и противоопухолевую активность, предположительно, предотвращая накопление активных свободных радикалов и перекисное окисление липидов в животных системах [2-4]. Обнаруженные нами эффекты также свидетельствуют о воздействии фуллеренола на редокс-статус растительной клетки. При этом в растительных организмах антиоксидантная активность полигидроксильированного фуллерена может быть связана с влиянием на систему синтеза и накопления фенольных соединений.

Работа проводилась в рамках выполнения задания 3.2.10 ГПНИ «Конвергенция» 2012-2015 гг., № гос. рег. 20123491.

Список литературы

1. Organic chemistry of fullerenes. Fullerenes: Chemistry, Physics and Technology / S.R. Wilson [et al.] // New York: Wiley-Interscience. – 2000. – P. 91–177.
2. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents / L.L. Dugan [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 9434–9439.
3. Fullerene based antioxidants and neurodegenerative disorders / L.L. Dugan [et al.] // Parkinson Relat Disord. – 2001. – Vol. 7. – P. 243–246.
4. Modulating activity of fullerol C₆₀(OH)₂₂ on doxorubicin-induced cytotoxicity / Bogdanovic, G., [et al.] // Toxicol in vitro. – 2004. – Vol. 18. – P. 629–637.
5. Husen, A. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system / A. Husen, K.S. Siddiqi // Journal of Nanobiotechnology. – 2014. – Vol. 12. – P. 16.
6. Multiwalled carbon nanotubes and C₆₀ fullerenes differentially impact the accumulation of weathered pesticides in four agricultural plants / R.D.L. Torre-Roche [et al.] // Environ Sci Technol. – 2013. – Vol. 47. – P. 12539–12547.
7. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*) / C. Kole [et al.] // BMC Biotechnol. – 2013. – Vol. 13. – P. 37.
8. Смиловенко, Л.А. Семеноводство с основами селекции полевых культур / Л.А. Смиловенко // М.-Ростов-на-Дону. – 2004. – С. 34–35.

9. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038-84. // 01.07.86. М. – 1985. – С. 5–9.
10. Folin, O. Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // J. Biol. Chem. – 1927. – Vol. 73, №2. – P. 627–650.
11. Singleton, V.L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphoungstic acid reagent / V.L. Singleton, J.A. Rossi // Am. J. Enol. Vitic. – 1965. – Vol. 16. – P. 144–158.
12. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical / M.S. Blois // Nature. – 1958. – Vol. 181. – P. 1199–1200.
13. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community / M.V. Khodakovskaya [et al.] // Small. – 2013. – Vol. 14. – P. 115–123.
14. Spectroscopic and physical properties of a highly derivatized C₆₀ fullerol / B.Vileno [et al.] // Adv Funct Mater. – 2006. – Vol. 16. – P. 120–128.
15. Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release / J.A.Brant [et al.] // J Colloid Interface Science. – 2007. – Vol. 314. – P. 281–288.
16. Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups / K.Okubo [et al.] // Nano. – 2008. – Vol. 2. – P. 327–333.
17. Обручева, Н.В. Физиология инициации прорастания семян / Н.В. Обручева, О.В. Антипова // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 2 – С. 287–302.
18. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants / G. Noctor [et al.] // Trends in Plant Science. – 2007. – Vol. 12, № 3. – P. 125–135.
19. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения. Распространение и метаболизм в растениях / М.Н. Запрометов // 1993. – М.: Наука. – 272 с.
20. Запрометов, М.Н. Фенилаланин-аммоний лиаза и образование фенольных соединений в проростках кукурузы / М.Н. Запрометов, С.В. Шипилова // Физиология растений. – 1972. – Т. 19, вып. 3. – С. 498–503.